

はこざき ひろかず

氏名（本籍地）	箱崎 宏和
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第124号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	モデル植物における生殖器官特異的遺伝子の分子遺伝学的解析
博士論文審査委員	（主査）教授 渡辺 正夫 教授 東谷 篤志 准教授 日出間 純 准教授 伊藤 幸博

## 論文内容の要旨

高等植物における生殖は種子生産上必須の事象である。日本の栽培作物の多くが  $F_1$  品種と呼ばれる一代雑種品種により生産されている(山川 1987)ことから、生殖は農業上重要な形質の1つである。 $F_1$  品種は、雄性不稔などに代表される植物生殖過程の人為的制御技術によるものであり、種子生産増大に結びつく。こういった観点から、雄性不稔を含む生殖機構全体像の解明は、学術的興味に留まらず、今後の食糧・産業飼料の増産につながり、経済に与える影響が大きい。

本研究ではミヤコグサ、イネの葯特異的遺伝子群の情報を基に、生殖器官の分化・発達に新たな知見を与えることを目的として実験を行った。これら葯特異的遺伝子群の解析は雄性配偶子形成や受粉・受精の遺伝子機能解析に貴重な情報を提供するものであり、有用な生殖形質の探索に貢献すると考えられる。 $F_1$  品種の作出には雄性不稔系統の利用が一般的であることから、葯特異的遺伝子群の解析を行うことで、雄性不稔などの高等植物における生殖過程の人為的制御技術を確立するための基礎的知見を与えることも本研究の目的の1つである。

### 第1章 ミヤコグサ小孢子期、葯特異的遺伝子の完全長 cDNA の単離

小孢子的非対称分裂に関する詳細な分子機構はまだ不明な点が多い。この理由の1つとして、シロイヌナズナ等のモデル植物において小孢子を含有する生殖器官が他の栄養組織に比べ小さく、解析の障害となっていることが挙げられる。このような現状を踏まえ、第1章では小孢子的発達・分化に新たな知見を与えることを目的として、マメ科モデル植物であるミヤコグサを用い、小孢子期の葯で特異的に発現する遺伝子群の中から選抜した遺伝子に関して、その完全長 cDNA の単離を行い、さらに各遺伝子の機能推定を試みた。

ミヤコグサ小孢子期葯で発現する EST のコンティグ化と完全長 cDNA を単離した。4つのコンティグに関し、完全長 cDNA を単離し、個々の遺伝子の相同性からそれぞれを *LjLTP1*, *LjHIR1*, *LjALDH1*, *LjCDC50* とした。これらの遺伝子は、小孢子期の葯で特異的発現を示すという報告は無く、新規な小孢子期葯特異的遺伝子であり、これらの遺伝子は、小孢子から2細胞性花粉に分化する際の非対称分裂やタペート細胞、葯壁の機能など、小孢子分化機構に有効な知見を与えるものであると考えられた。

### 第2章 シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を用いた生殖形質に関わる変異体の単離

植物の発達過程、特殊環境条件下での生育や変異体解析をするにあたり、大規模かつ網羅的に遺伝子発現をモニタリングする手法が一部の植物で確立されつつあり、マイクロアレイなどの手法により精力的に行われている。しかし、一部の植物で大規模に器官特異的遺伝子群の発現解析が可能になった現在にお

いても、全ての遺伝子機能、生命現象の全体像を解明するには至っていない。そのため、各々の遺伝子機能を解明することは生命現象の全容を明らかにする第1段階であり、大規模解析後のステップの1つである。このような観点から、第2章ではイネ葯特異的遺伝子群の一部に着目し、各々の遺伝子機能を同定することを目的として、イネ葯特異的遺伝子の変異による雄性不稔変異体の単離を行ない、イネ葯特異的遺伝子群に対してシロイヌナズナを研究材料に用いた。

イネ葯特異的遺伝子を用い、シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体と逆遺伝学的手法により、生殖形質に異常が見られる以下の3つの変異体を単離・解析した。1) ARM ドメインを持つ *At4g34940* の変異体で、T-DNA の分離比と野生型との相互交配で配偶体型雄性不稔であることを明らかにした。この変異体は、花粉形成は正常に行われるが、その後の受粉・受精が正常に行われないことを明らかにした。*At4g34940* は、ARM ドメイン以外に機能ドメインを持たない遺伝子で、その解析例が存在しないことから、新規な機能を有する ARM ドメイン遺伝子であると考えられた。また ARM ドメインは、細胞内の情報伝達や細胞骨格の制御に関与していると考えられており、*At4g34940* は花粉管伸長時に機能を果たしていると考えられた。2) KAS II をコードする *At1g74960* の変異体で、T-DNA の分離比から胚性致死であることを明らかにした。この胚性致死変異体は、第3章で詳細な解析を行った。3) UGPase をコードする *At3g03250* と *At5g17310* の二重変異体で、これらの T-DNA ホモ挿入個体は、種子が全く形成されず野生型の花粉をこの変異体に受粉させたところ正常な種子が形成されたことから、胞子体型雄性不稔であることを明らかにした。この胞子体型雄性不稔は、第4章で詳細な解析を行った。

### 第3章 胚性致死変異体 *Arabidopsis thaliana* 3-ketoacyl-ACP synthase 2 (*atkas2*) の解析

第2章で解析を行った *At1g74960* は 3-ketoacyl-ACP synthase II (KAS II) をコードする遺伝子であった。3-ketoacyl-ACP synthase (KAS) はクライゼン縮合反応を触媒する酵素である。KAS タンパク質はその機能によって KAS I, KAS II, KAS III の3つのクラスターに分類される。KAS III は脂肪酸合成の初期ステップである acyl-CoA と malonyl-ACP の縮合反応を担っており、KAS I はステアリン酸までの炭素鎖の伸長反応、KAS II はステアリン酸からパルミチン酸への炭素鎖の伸長反応を担っている。第3章では、シロイヌナズナにおける KAS II を *AtKAS2*、第2章で胚性致死変異体として単離された変異体を *atkas2* とし、どのようなメカニズムで胚致死性を示すのかを解明することを目的とした。

*AtKAS2* 遺伝子のプロモーター領域を単離し、プロモーター::GUS 解析により *AtKAS2* の発現解析を行った。さらに、このプロモーター領域と *AtKAS2* のコード領域を *atkas2* に遺伝子導入し、遺伝子機能補完について検討を行った。*atkas2* 胚の発生過程を調査したところ、*atkas2* の胚は球状胚で分化が停止していることがわかった。*AtKAS2* は胚特異的発現を示さず、子葉、葉、花粉などの器官で発現することがわか

った。また、遺伝子機能補完実験により、*atkas2* の原因遺伝子は *AtKAS2* (*At1g74960*) であることを証明した。シロイヌナズナにおいて、胚性致死変異体の多くは球状胚から心臓型胚への移行が阻害されるものであることが報告されている。このため、球状胚から心臓型胚への分化は感受性が強い分化過程であり、第2章で解析を行った *atkas2* 変異体もこれに属する変異体と考えられた。*AtKAS2* はプラスチドにおける脂肪酸合成に必要であり、*atkas2* ではプラスチドの機能不全により胚性致死の表現型を示すと考えられた。また、クロロプラストの正常な機能を維持するには *AtKAS2* が必要であることから、ステアリン酸と正常なクロロプラストの分化が球状胚から心臓型胚に移行する時期に必要であると考えられた。

#### 第4章 胞子体型雄性不稔変異体 *Arabidopsis thaliana* UDP-glucose pyrophosphorylase 1, 2 (*atugp1, 2*) の解析

第2章で解析を行った *At3g03250* と *At5g17310* は UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) をコードする遺伝子であった。UGPase は全ての原核生物と真核生物に存在する炭素代謝に重要な酵素であり、glucose 1-phosphate と UTP を UDP-glucose と phosphate に転化する可逆反応を触媒する酵素である。第4章では、第2章で解析を行った *At3g03250* を *AtUGP1*、*At5g17310* を *AtUGP2* とし、新規に単離された *atugp1, 2* 変異体がどのようなメカニズムで胞子体型雄性不稔性を示すのかを解明することを目的とした。

RT-PCR により *AtUGP1* と *AtUGP2* の発現解析を行った。*atugp1, 2* 変異体の葯に関して、花粉母細胞期葯から3細胞性成熟花粉期葯の表現型解析を行った。さらに、*atugp1, 2* 変異体の成熟葉横断面の表現型解析を行った。表現型解析の結果、*atugp1, 2* 変異体の四分子はカロース膜が正常に分化せず、そのことにより胞子体型雄性不稔性を示すことを明らかにした。また、*atugp1, 2* 変異体では植物体が矮小化することを明らかにした。これらのことから、UDP-glucose の生合成と異化に関わる酵素群の一部が欠損した場合、セルロースやカロースの合成が正常に行われず、植物体の生育、花粉形成が阻害されることが考えられた。

本研究ではミヤコグサにおいて小胞子期葯特異的遺伝子を解析し、シロイヌナズナにおいて雄性不稔変異体と胚性致死変異体を単離・解析することで、生殖器官の形成・発達過程の解明に貢献した。本研究によって得られた成果は、雄性不稔や花粉拡散防止を含む高等植物の生殖機構を人為的に制御する技術の確立や、それらを実用作物に応用する際に重要な知見を与えるものであると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

高等植物における生殖過程の特定のフェーズについては、遺伝子レベルでの解析も進み、博物学的記載の域を脱しつつある。しかしながら、その全体像を解明するために、生殖過程で機能している遺伝子機能解明が重要である。本研究では、モデル植物イネにおいて同定した生殖器官特異的遺伝子について、分子遺伝学的解析が容易なモデル植物シロイヌナズナと同祖遺伝子の変異体を分子生物学的な手法により解析することで、生殖過程における機能の一端を明らかにした。

同祖性遺伝子の候補として、At4g34940, At1g74960, At3g03250, At5g17310 を解析した。At4g34940 変異体では、配偶体型雄性不稔であることを見出した。At1g74960 変異体は胚性致死であった。At3g03250, At5g17310 の二重変異体では孢子体型雄性不稔であることを観察した。

At1g74960 は KASII (3-ketoacyl-ACP synthase 2) をコードしており、胚致死は球状胚のステージであった。KASII がプラスチドにおけるステアリン酸からパルミチン酸への伸長反応を担っていることから、球状胚から心臓型胚に移行するためには、ステアリン酸と正常なクロロプラストの分化が必要であると考察した。

At3g03250, At5g17310 は、いずれも UGPase をコードし、その酵素は、glucose 1-phosphate と UTP を UDP-glucose と phosphate に転化することを可逆的に触媒する。それぞれの独立な変異体では表現型は見られず、二重変異体にしたときに孢子体型雄性不稔が観察された。孢子体型の原因は、四分子のカロース膜に異常が見られ、その後の小孢子への分化が阻害されるためであった。また、この二重変異体は植物個体の矮小化も観察された。以上の点から、UDP-glucose の生合成と異化に関わる酵素群の一部を欠損した場合、カロース、セルロース合成が異常になり、花粉形成・生育阻害が生じたと考察した。

本研究で得られた知見は高等植物における生殖器官の分化、受粉、受精、胚発生における特異的遺伝子の機能と生物学的意義を解明する上で重要であると考えられ、本研究を推進した箱崎宏和は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有し、箱崎の提出した論文は博士(生命科学)の博士論文として合格と認める。